

脂蛋白电子显微结构研究的优化负染方法*

童慧敏^{1, 2)} 张磊²⁾ 黄丽清¹⁾ 任罡^{2)**}

¹⁾ 物质非平衡合成与调控教育部重点实验室, 西安交通大学理学院, 西安 710049;

²⁾ The Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA)

摘要 人类心血管等疾病与胆固醇含量的高低有着十分密切的关系。人体内胆固醇主要通过血液中的脂蛋白来调节和运载。因此, 新一代调节胆固醇的药物设计迫切地需要揭示脂蛋白分子结构与功能之间的关系。由于脂蛋白分子的成分高度复杂、结构特征灵活、尺寸微小, 传统的蛋白质结构标定技术, 如 X 射线衍射、核磁共振谱、质谱和冷冻电子显微镜等手段都面临着巨大的困难。针对这一问题, 任罡小组最近提出一种优化的电镜负染制备方法, 可以观测到单个脂蛋白分子的空间结构。此方法应用的成功, 使得对单个脂蛋白分子的结构研究成为可能。同时也证明该负染色技术作为一种普遍的实验手段, 可以用于对蛋白质小分子的结构研究, 从而将促进新一代蛋白质分子药物的研发。

关键词 透射电子显微镜, 冷冻电镜法, 脂蛋白结构, 优化的负染色方法, 蛋白质结构与功能

学科分类号 Q-33, Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00224

脂蛋白(lipoprotein)是各种脂质与蛋白质结合在一起而形成的复合物。脂蛋白中脂质与蛋白质之间没有共价键结合, 多数是通过脂质的非极性部分与蛋白质组分之间以疏水性相互作用而结合在一起。脂蛋白在人体中起着重要的生物学作用, 它不仅是人体内脂类物质运输的载体, 而且是与心血管疾病相关的极为重要的蛋白质, 甚至在老年性痴呆症、免疫控制和认知等领域都可以找到它的身影。为了揭示脂蛋白的功能, 科研工作者必须首先了解脂蛋白的三维空间结构。但是由于脂蛋白本身结构的柔性及极强的活性, 给依赖于大量全同结构粒子才能进行三维重构的 X 射线晶体法等方法带来巨大的困难。相对比较, 可以单独确定每个脂蛋白分子空间位置的透射电子显微镜就为我们提供了一个非常有效的研究途径^[1]。

透射电镜测量方法主要有冷冻电镜法和负染色电镜法。冷冻电镜法主要步骤是将处于自然状态的生物大分子溶液瞬间冷冻^[2-6], 所以样品受周围环境变化影响时间短, 受其他溶剂影响小, 故更能反映样品的真实状态。但是冷冻电镜法得到的图像一般衬度较差, 信噪比较低。负染色电镜技术最早由

Brenner 和 Horne 于 1959 年提出^[7], 主要步骤是应用一定的操作流程, 使重金属颗粒附着在研究对象表面以增强所得图像的信噪比^[8], 是一种研究细胞组织、高分子和生物大分子的简单、快捷和有效的方法。由于负染方法得到的照片衬度高和电子辐照性强, 使其在当前生物大分子结构研究领域被广泛应用^[9]。但是在对脂蛋白进行负染时, 染色剂中的化学成分可能会和脂蛋白反应, 影响脂蛋白的自然结构而产生透射图像假象^[10-13]。

脂蛋白复合物中的蛋白质组分称为载脂蛋白, 人体内的脂类必须与载脂蛋白相结合才可以在人体组织间传输。载脂蛋白 E 是人体血浆和中央神经系统的重要组成部分^[14-15]。通过与磷脂的相互作用, 载脂蛋白 E 在磷脂传输、胆固醇平衡和神经元细胞成型过程中起着关键作用^[16]。载脂蛋白 E 通常有三种形态(载脂蛋白 E2、载脂蛋白 E3 和载脂

* 美国能源部基础能源科学办公室资助项目 (DE-AC02-05CH11231).

** 通讯联系人.

Tel: 0510-4952375, E-mail: gren@lbl.gov

收稿日期: 2012-05-10, 接受日期: 2012-07-10

蛋白 E4), 且不同形态的载脂蛋白 E 有着不同的功能, 比如它们对血浆胆固醇水平有着不同的作用^[17]. 其中载脂蛋白 E4 与血浆高胆固醇水平和低密度脂蛋白水平有关系, 因此也与心血管疾病危险升高有关系^[18-19]. 另外, 载脂蛋白 E4 也被普遍认为是表征偶发性与晚发性老年性痴呆症的一个主要危险因素^[20-21].

任罡小组在最近发表的两篇论文中就载脂蛋白 E4 和 POPC 磷脂的聚合物载脂蛋白 E4•POPC 为研究对象^[10, 13], 介绍了一种优化的负染色电镜测试方法, 成功地得到了接近自然状态下的高分辨率的单颗粒脂蛋白图像, 使得对脂蛋白结构的电镜研究变得简便又可信.

1 脂蛋白电镜负染方法的优化

1.1 传统负染色方法的流程与结果

目前通用的脂蛋白负染流程是由 Forte 等^[22-23]在 1971 年提出并发展起来的, 其重要染色剂是磷钨酸钠盐(PTA). 我们在论文中重复了这个负染流程(图 1a). 首先将浓度为 0.1 g/L 脂蛋白溶液和 2% 磷钨酸钠盐溶液以体积比 1:1 相混合. 然后, 将约 4 μ l 的混合溶液滴到经辉光放电处理后的载物铜网上. 1 min 后, 用滤纸将多余的溶液从铜网侧边或底面吸除. 最后, 铜网在空气中自然风干并待用^[13].

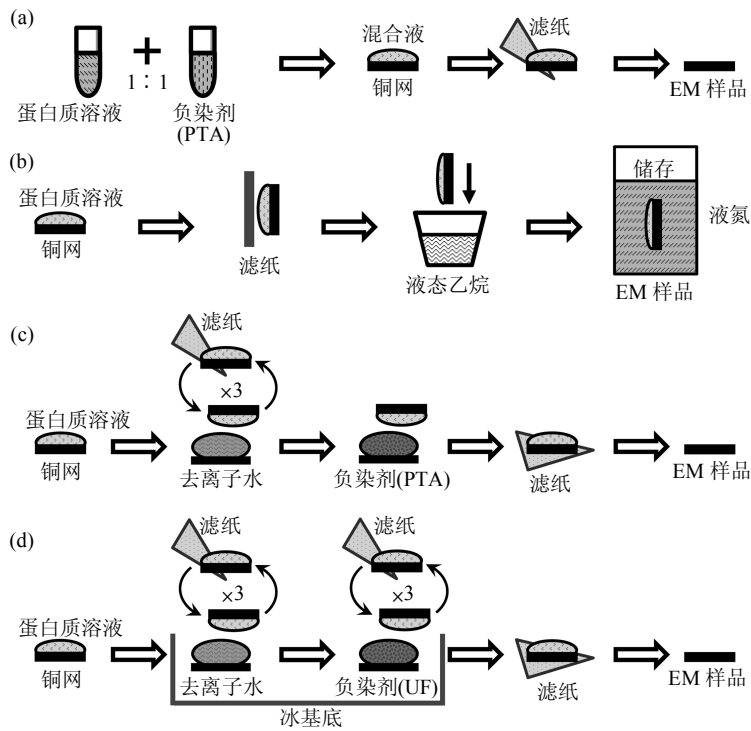


Fig. 1 Different protocols used for preparing lipoprotein EM samples
图 1 制备脂蛋白电子显微镜样品的不同方法

(a) 传统负染方法流程. (b) 冷冻电镜法流程. (c) 传统负染加水洗法流程. (d) 优化的负染法流程.

图 2a 是用电子显微镜负染方法得到的载脂蛋白 E4•POPC 的负染电镜图像. 图像显示载脂蛋白 E4•POPC 分子都形成了碟串状聚合物. 在这种聚合物中, 各分子颗粒之间都有黑色的边界; 各颗粒

的表面大部分相互平行; 每个颗粒的长轴方向基本垂直于聚合物中轴方向. 这些特征都与之前的大量负染研究结果相似^[24-27].

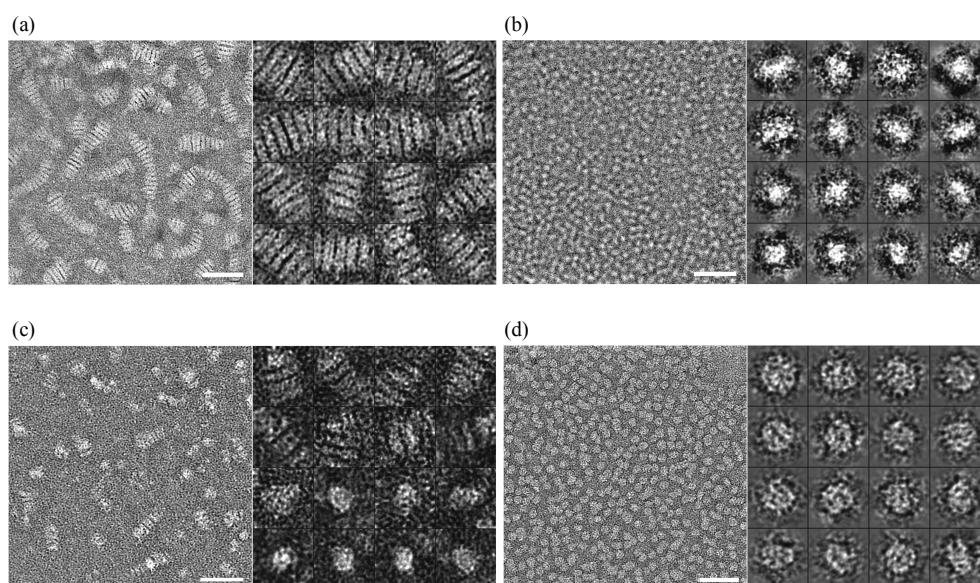


Fig. 2 Electron micrographs of the apoE4•POPC particles prepared using different protocols^[13]

图 2 不同方法得到的载脂蛋白 E4•POPC 的电子显微镜图像^[13]

(a) 传统负染方法. (b) 冷冻电镜法. (c) 传统负染加水洗法. (d) 优化的负染法. (子图中左图为大范围 EM 图像, 标尺长度=50 nm. 右图为选出的蛋白质颗粒图, 方格尺寸=30 nm).

1.2 传统负染方法结果和冷冻电镜法结果的比较

由于碟串状载脂蛋白 E4•POPC 聚合物仅在这种负染流程下才会出现, 我们又应用了能更加反映颗粒真实自然状态的冷冻电子显微镜方法(图 1b)来观察载脂蛋白 E4•POPC 的图像, 以作为对比.

图 2b 是用这种冷冻电镜方法得到的载脂蛋白 E4•POPC 的冷冻电镜图像. 从图 2b 中我们可以看到载脂蛋白 E4•POPC 分子都是分离的圆形或者椭圆形颗粒. 为了表征载脂蛋白 E4•POPC 颗粒的

形状, 我们又统计了颗粒的长短轴比例(图 3c 和表 1). 结果显示: 由传统负染方法得到的载脂蛋白 E4•POPC 图像中, 有 90%以上的颗粒分布在 2.5 至 5.5 这一区间, 且峰值出现在 3.8 处, 说明大部分颗粒都是长条状, 而由冷冻电镜得到的结果来看, 有 90%以上的颗粒的长短轴比例分布在 1.0~1.8 区间, 且峰值仅为 1.3, 说明大部分颗粒都是椭圆形.

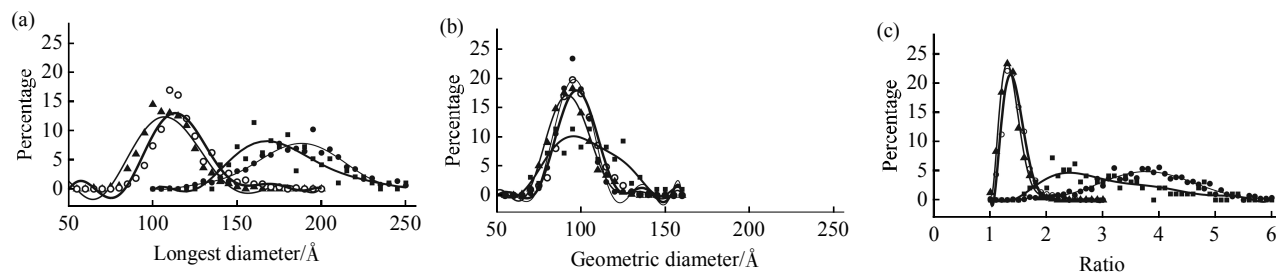


Fig. 3 Histograms and fittings of particle size and shape of the apoE4•POPC prepared by different NS protocols^[13]

图 3 不同负染方法下载脂蛋白 E4•POPC 的尺寸形状统计直方图与拟合结果^[13]

(a) 最长直径(步长=5Å). (b) 几何平均直径(步长=5Å). (c) 长短轴比(步长=0.1). ●: Conv-NS; ▲: Cryo; ■: Conv-NS+wash; ○: Optimized NS.

Table 1 Statistics of particle size of the apoE4•POPC prepared by different NS protocols

表 1 不同负染方法下载脂蛋白 E4•POPC 尺寸的统计结果

		冷冻电镜方法	传统负染方法	传统负染加水洗	优化负染方法
颗粒总数		554	826	97	598
最长直径	峰值(Å)	107.0±2.5	188.2±2.5	167.6±2.5	113.2±2.5
	峰值百分比	12.3%	7.8%	8.2%	13.0%
几何平均直径	峰值(Å)	92.0±2.5	95.8±2.5	95.4±2.5	97.4±2.5
	峰值百分比	17.1%	19.8%	10.1%	17.9%
长短轴比	峰值	1.30	3.80	2.40	1.36
	峰值百分比	23.3%	4.9%	4.7%	21.4%

这些结果说明, 由传统负染方法得到的载脂蛋白 E4•POPC 的形状与冷冻电镜相比有很大的不同, 而又由于冷冻电镜的结果更应该接近于载脂蛋白 E4•POPC 的真实状态, 所以碟串状这一载脂蛋白 E4•POPC 聚合物应该是由传统负染技术造成的假象.

1.3 盐浓度和染色剂对载脂蛋白 E4•POPC 染色结果的影响

人们发现, 盐浓度的变化会对脂蛋白的结构产生影响^[28], 而大多数载脂蛋白 E4•POPC 的缓冲液中盐分含量都较高, 所以我们首先对染色剂中盐浓度对负染结果的影响进行了分析. 图 1c 是加入了水洗过程以降低原载脂蛋白 E4•POPC 的缓冲液中残留盐分的流程. 具体步骤是: 首先将脂蛋白溶液滴在经辉光放电处理的铜网上停留约 1 min, 然后用 3 滴去离子水将铜网清洗 3 遍, 清洗前后要用滤纸将多余液体吸除, 然后再用磷钨酸钠盐进行染色.

图 2c 是经过水洗处理后的载脂蛋白 E4•POPC 图像. 与传统负染结果(图 2a)相比, 虽然仍然存在类似的碟串状聚合物, 但是这些聚合物变短且碟状载脂蛋白 E4•POPC 的厚度加大了. 而且更为可喜的是, 一些分离态的载脂蛋白 E4•POPC 出现了. 虽然这些离散的颗粒在尺寸上有很大变化, 但是它们的形态主要是圆形或椭圆形. 为了定量显示这一方法的负染结果, 与上面的统计方法一样, 我们挑选出了 97 个载脂蛋白 E4•POPC 颗粒来进行统计. 结果显示(图 3 和表 1): 对最长直径, 此时载脂蛋白 E4•POPC 颗粒主要集中在 125~230Å, 与传统负染结果类似. 峰值出现在(167.6 ± 2.5)Å, 比传统方法小了约 20Å, 但是比冷冻电镜方法结果足足大了约 60Å, 对几何平均直径, 其结果与传统负

染方法和冷冻电镜方法都很相似, 且峰值出现在(95.4 ± 2.5)Å, 对长短轴比例, 其大部分处于 1.7~3.5 之间, 峰值在 2.4 处, 虽然显著大于冷冻电镜结果, 但明显小于传统方法结果.

磷钨酸钠盐(PTA, pH 7.4)是一种 pH 值在正常生理水平上的杂多酸, 被广泛地应用于众多生物样品的负染过程中^[9, 29-30]. 磷钨酸钠盐初次被应用到电子显微镜领域大约是在近半个世纪以前^[22, 31]. 此后, 有研究发现磷钨酸钠盐会与脂蛋白作用并引起一种称为“髓鞘图像”的双亲分子膜的堆积^[32]. 而且在过去的 20 年间, 应用磷钨酸钠盐作为染色剂来研究载脂蛋白 E4•POPC 的结果都显示, 载脂蛋白 E4•POPC 都形成了碟串状聚合物. 因此, 磷钨酸钠盐与磷脂类分子的反应, 应该就是造成传统负染方法假象的根本原因.

1.4 优化的负染色方法流程与结果

为了避免染色剂磷钨酸钠盐对脂蛋白所带来的负染假象, 我们尝试了其他许多种染色剂, 并参考了 Melanie 等的染色流程^[9], 最终发现, 当应用甲酸双氧铀(UF)代替磷钨酸钠盐, 且应用如下染色流程时, 载脂蛋白 E4•POPC 颗粒可以呈现出非常好的圆形或椭圆形的离散颗粒形态. 图 1d 是优化后的脂蛋白负染流程示意图. 主要步骤包括^[13]: 首先将用 PBS 稀释后的载脂蛋白 E4•POPC 溶液滴到经过辉光放电的铜网上, 并停留约 1 min, 环境温度控制在 4℃ 以下. 然后将铜网用 3 滴置于冰基底上以保持低温的去离子水快速清洗, 每次清洗前后用滤纸将多余液体吸除. 最后将铜网用 3 滴(每滴约 30 μl)甲酸双氧铀快速染色, 每次染色前后用滤纸将多余液体吸除, 并最终停留在最后一滴甲酸双氧铀染色剂上约 5 min, 甲酸双氧铀同样置于冰基底上以保持低温并遮光; 染色后的铜网用滤纸从背面

将多余液体吸除后,在常温下自然风干备用。

除了染色剂的更换,我们的方法最大限度地考虑了实验过程中其他因素的干扰。首先,应用3滴去离子水基本消除了原载脂蛋白E4•POPC溶液中的缓冲剂盐分影响;其次,又应用了3滴染色剂进行循环染色,最大限度地保证了铜网表面的染色剂浓度;再者,负染过程全部是在低温条件下进行,降低了空气中氧气对脂蛋白可能造成的氧化作用,并减弱了脂蛋白的结构变化活性;最后,由于甲酸双氧铀溶液在光线照射下会发生分解,所以我们在所有加入染色剂的环节中都进行了遮光保护。

图2d是应用我们优化后的负染色方法得到的载脂蛋白E4•POPC电镜图像。经过对598个挑选出来的载脂蛋白E4•POPC颗粒的定量测量(图3和表1),颗粒最长直径的峰值在 $(113.2 \pm 2.5) \text{ \AA}$,大约比冷冻电镜结果大了6Å(约5%),但是比传统方法得到的 $(188.2 \pm 2.5) \text{ \AA}$ 明显小了许多。此外,此方法得到的颗粒几何平均直径的峰值在 $(97.4 \pm 2.5) \text{ \AA}$,也同样比冷冻电镜结果大了约6%。最为重要的是,颗粒长短轴比例分布情况显示峰值出现在1.36,与冷冻电镜的结果的差别小于5%,与传统方法得到的3.8峰值有着巨大的差别。

应用这个优化后的染色方法,不仅消除了传统染色方法带来的结构假象,所得的结构又非常接近于冷冻电镜结果,同时,所得的负染图像与冷冻电镜图像相比衬度得到显著提高,许多内部的细节被清晰显现出来,因此这一染色技术非常适用于一般

实验室观察磷脂绑定状态下的载脂蛋白E的形态学变化,甚至可以依此来确定载脂蛋白E的三维基本形态,并使得载脂蛋白E的三维结构重构(用单颗粒分析技术或电子断层成像技术)成为可能。

事实上,双氧铀类染色剂,包括乙酸双氧铀、硝酸双氧铀和甲酸双氧铀,早就是许多生物样品的染色剂^[9]。与负电性的磷钨酸钠盐不同,甲酸双氧铀是正电性的,而磷脂的头部亲水部分也是正电性的,所以磷钨酸钠盐可能会与磷脂反应造成假象,而甲酸双氧铀就避免了这种反应。此外,在双氧铀类染色剂中,甲酸双氧铀的颗粒度最小,干燥颗粒尺度仅为0.3 nm左右^[33-34],比磷钨酸钠盐干燥后颗粒尺度(1.2 nm左右)要小得多,可以提供最佳的负染结构细节^[9]。这一优势对于分子质量在100 ku以下的生物大分子的染色效果是非常重要的^[9]。甲酸双氧铀唯一的缺点就是甲酸双氧铀水溶液不稳定,在光照下会发生分解。因此在实际应用中,我们是在遮光条件下对生物样品进行染色的。

2 优化后负染色方法的普适性

应用优化后的负染色方法^[13],我们对重组载脂蛋白A-1高密度脂蛋白的主要子类,包括7.8、9.6 nm重组高密度脂蛋白和9.3 nm球状重组高密度脂蛋白,进行了负染。图4a~c就是7.8、9.6和9.3 nm球状这3类重组高密度脂蛋白的负染结果,可以看到,每种重组高密度脂蛋白都可以形成颗粒分离、清晰的电镜图像。

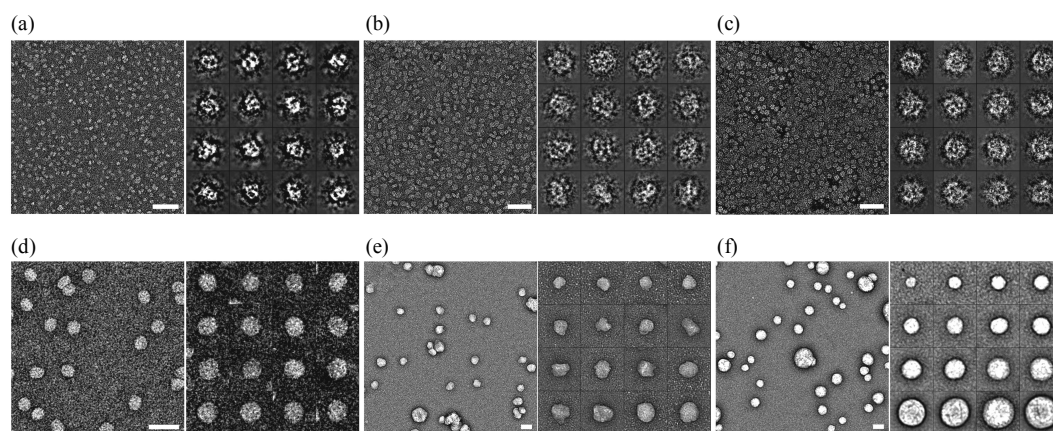


Fig. 4 Structure and morphology of other lipoprotein samples prepared by the optimized NS-EM protocol^[10]

图4 用优化的负染电镜方法得到的其他脂蛋白形貌^[10]

(a) 7.8 nm 重组高密度脂蛋白。(b) 9.6 nm 重组高密度脂蛋白。(c) 9.3 nm 球状重组高密度脂蛋白。(d) 低密度脂蛋白(子类3)。(e) 中密度脂蛋白。(f) 极低密度脂蛋白。(子图中左图为大范围EM图像,标尺长度=50 nm。右图为选出的蛋白质颗粒图,方格尺寸:(a~c) 30 nm; (d) 50 nm; (e, f) 100 nm)。

我们又负染了人体内含载脂蛋白 B-100 的主要脂蛋白: 低密度脂蛋白(子类 3), 中密度脂蛋白和极低密度脂蛋白。所得电镜负染图像显示(图 4d~f), 所有的脂蛋白颗粒都是分离的, 没有聚合物出现, 说明我们的优化负染方法同样适合于低密度脂蛋白类的染色。

3 研究意义与展望

我们研究了不同染色方法对含磷脂的脂蛋白造成的影响并发现: 传统负染方案中的磷钨酸钠盐会与脂蛋白中的磷脂成分反应而使脂蛋白在负染后呈现碟串状聚合形态; 蛋白质溶液中的盐分会影响聚合物的形态, 高浓度盐会加重聚合程度而低浓度盐会降低聚合程度, 但是盐分并不是决定聚合与否的根本因素; 甲酸双氧铀是脂蛋白的理想染色剂。基于这些发现, 我们提出了一种针对脂蛋白的优化的电镜负染色方法, 解决了该领域 40 余年以来存在的负染假象问题。优化的负染色方法不仅极大地保留了脂蛋白的自然状态, 而且大大提高了电镜图像的分辨率, 使得脂蛋白的负染电镜结构与功能研究成为可能^[3, 10, 35-37]。

参 考 文 献

- [1] Zhang L, Ren G. IPET and FETR: experimental approach for studying molecular structure dynamics by cryo-electron tomography of a single-molecule structure. *PLoS One*, 2012, **7**(1): e30249
- [2] Taylor K A, Glaeser R M. Electron microscopy of frozen hydrated biological specimens. *J Ultrastruct Res*, 1976, **55**(3): 448-456
- [3] Ren G, Zhang L. Asymmetric small protein structure determination by individual particle electron tomography. *Biophys J*, 2012, **102**(3): 394a
- [4] Zhang L, Ren G. Structural determination of heterogeneous protein by individual-particle electron tomography-combination of electron tomography and local refinement reconstruction method for high-resolution structural determination of each individual protein particle. *Biophys J*, 2010, **98**(3): 441a
- [5] Zhang L, Cavignolo G, Oda M, *et al.* A method to study the time-dependent remodeling of high density lipoproteins by individual-particle electron cryo-tomography. *Biophys J*, 2010, **98**(3): 440a
- [6] Ren G, Rudenko G, Ludtke S J, *et al.* Model of human low-density lipoprotein and bound receptor based on cryoEM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(3): 1059-1064
- [7] Brenner S, Horne R W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1959, **34**(1): 103-110
- [8] Leberman R. Use of uranyl formate as a negative stain. *J Mol Biol*, 1965, **13**(2): 606
- [9] Ohi M, Li Y, Cheng Y, *et al.* Negative staining and image classification - powerful tools in modern electron microscopy. *Biol Proced Online*, 2004, **6**: 23-34
- [10] Zhang L, Song J, Cavignolo G, *et al.* Morphology and structure of lipoproteins revealed by an optimized negative-staining protocol of electron microscopy. *J Lipid Res*, 2011, **52**(1): 175-184
- [11] Chen B, Ren X, Neville T, *et al.* Apolipoprotein AI tertiary structures determine stability and phospholipid-binding activity of discoidal high-density lipoprotein particles of different sizes. *Protein Sci*, 2009, **18**(5): 921-935
- [12] Silva R A, Huang R, Morris J, *et al.* Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(34): 12176-12181
- [13] Zhang L, Song J, Newhouse Y, *et al.* An optimized negative-staining protocol of electron microscopy for apoE4•POPC lipoprotein. *J Lipid Res*, 2010, **51**(5): 1228-1236
- [14] Mahley R W, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. *Curr Opin Lipidol*, 1999, **10**(3): 207-217
- [15] Elshourbagy N A, Liao W S, Mahley R W, *et al.* Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**(1): 203-207
- [16] Mahley R W, Rall S C, Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2000, **1**: 507-537
- [17] Weisgraber K H, Rall S C, Jr., Mahley R W. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem*, 1981, **256** (17): 9077-9083
- [18] Mahley R W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988, **240**(4852): 622-630
- [19] Weisgraber K H. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem*, 1994, **45**: 249-302
- [20] Saunders A M, Strittmatter W J, Schmechel D, *et al.* Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 1993, **43**(8): 1467-1472
- [21] Weisgraber K H, Mahley R W. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *Faseb J*, 1996, **10**(13): 1485-1494
- [22] Forte T, Norum K R, Glomset J A, *et al.* Plasma lipoproteins in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency: structure of low and high density lipoproteins as revealed by electron microscopy. *J Clin Invest*, 1971, **50**(5): 1141-1148
- [23] Forte T M, Nordhausen R W. Electron microscopy of negatively stained lipoproteins. *Methods Enzymol*, 1986, **128**: 442-457
- [24] Schneeweis L A, Koppaka V, Lund-Katz S, *et al.* Structural analysis of lipoprotein E particles. *Biochemistry*, 2005, **44** (37): 12525-12534
- [25] Li X, Kan H Y, Lavrentiadou S, *et al.* Reconstituted discoidal ApoE-phospholipid particles are ligands for the scavenger receptor BI. The amino-terminal 1-165 domain of ApoE suffices for receptor

- binding. J Biol Chem, 2002, **277**(24): 21149–21157
- [26] Lu B, Morrow J A, Weisgraber K H. Conformational reorganization of the four-helix bundle of human apolipoprotein E in binding to phospholipid. J Biol Chem, 2000, **275**(27): 20775–20781
- [27] Gorshkova I N, Kypreos K E, Gantz D L, *et al.* Biophysical properties of apolipoprotein E4 variants: implications in molecular mechanisms of correction of hypertriglyceridemia. Biochemistry, 2008, **47**(47): 12644–12654
- [28] Jayaraman S, Gantz D L, Gursky O. Effects of salt on the thermal stability of human plasma high-density lipoprotein. Biochemistry, 2006, **45**(14): 4620–4628
- [29] Oliver R M. Negative stain electron microscopy of protein macromolecules. Methods Enzymol, 1973, **27**: 616–672
- [30] Woeste S, Demchick P. New version of the negative stain. Appl Environ Microbiol, 1991, **57**(6): 1858–1859
- [31] Nichols A V, Forte G M, Coggiola E L. Electron microscopy of very low density lipoproteins from egg yolk using negative staining. Biochim Biophys Acta, 1969, **175**(2): 451–453
- [32] Melchior V, Hollingshead C J, Cahoon M E. Stacking in lipid vesicle-tubulin mixtures is an artifact of negative staining. J Cell Biol, 1980, **86**(3): 881–884
- [33] Harris J R, Gebauer W, Sohngen S M, *et al.* Keyhole limpet hemocyanin (KLH), II: Characteristic reassociation properties of purified KLH1 and KLH2. Micron, 1997, **28**(1): 43–56
- [34] Harris J R, Gebauer W, Guderian F U, *et al.* Keyhole limpet hemocyanin (KLH), I: Reassociation from Immucothel followed by separation of KLH1 and KLH2. Micron, 1997, **28**(1): 31–41
- [35] Zhang L, Ren G. Determining the dynamic protein structure by individual-particle electron tomography: An individual antibody structure at a nanometer resolution. Biophys J, 2010, **98**(3): 441a
- [36] Zhang L, Kaspar A, Woodnutt G, *et al.* Monitoring the structural changes of conjugated antibodies by high-resolution electron microscopy and individual-particle electron tomography. Biophys J, 2010, **98**(3): 440a–441a
- [37] Zhang L, Cavigliolo G, Wang J, *et al.* Structure of 9.6 nm discoidal high-density lipoprotein revealed by individual-particle electron tomography. Biophys J, 2010, **98**(3): 440a